

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. August 2005 (11.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/073402 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**,  
G01N 33/58

**WINTERHALTER, Mathias** [DE/DE]; Ziegeleiweg  
50, 28757 Bremen (DE). **MEIER, Wolfgang** [CH/CH];  
Belchenstrasse 6, CH-4106 Therwil (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/001039

(74) **Anwalt: SENDROWSKI, Heiko**; Eisenführ, Speiser &  
Partner, Postfach 10 60 78, 28060 Bremen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
2. Februar 2005 (02.02.2005)

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,  
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,  
ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
04002214.7 2. Februar 2004 (02.02.2004) EP

(71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **INTERNATIONAL UNIVERSITY BREMEN  
GMBH** [DE/DE]; Campus Ring 1, 28759 Bremen (DE).  
**UNIVERSITÄT BASEL** [CH/CH]; Petersgraben 35,  
CH-4003 Basel (CH).

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,  
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

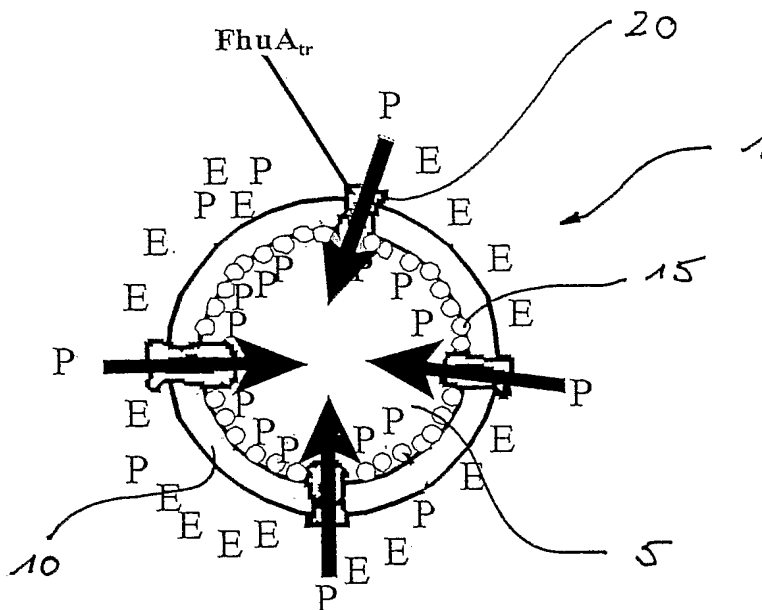
(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **SCHWANEBERG,  
Ulrich** [DE/DE]; Lehmbarg 26, 27721 Ritterhude (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** VESICLE USED TO SEPARATE SUBSTANCES FROM LIQUID MEDIA

(54) **Bezeichnung:** VESIKEL ZUM ABTRENNEN VON SUBSTANZEN AUS FLÜSSIGEN MEDIEN



(57) **Abstract:** The invention relates to a  
method which is used to separate substances  
from liquid media and suitable separation  
means therefor.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung  
betrifft Verfahren zum Abtrennen von  
Substanzen aus flüssigen Medien und dazu  
geeignete Trennmittel.

WO 2005/073402 A1



**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

---

## Vesikel zum Abtrennen von Substanzen aus flüssigen Medien

---

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Abtrennen von Substanzen aus flüssigen Medien und dazu geeignete Trennmittel.

Zum Abtrennen von Substanzen aus flüssigen Medien sind eine Reihe von Verfahren und Trennmitteln bekannt. Besondere Bedeutung im Bereich der Biochemie haben adsorptive Verfahren erlangt wie die Adsorptions-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und dergleichen. Bei adsorptiven Verfahren bindet die abzutrennende Substanz an ein Trägermaterial, zumeist eine festen Phase, und wird zusammen mit dem Trägermaterial vom flüssigen Medium abgetrennt. Üblicherweise verwendet werden Trägermaterialien mit einer hohen spezifischen Oberfläche, insbesondere Glasperlen und Polymerperlen. Zum Vergrößern der Oberfläche können die Trägermaterialien zudem porös sein, so dass auch im Inneren des

Trägermaterials Oberflächen zum Binden der abzutrennenden Substanz zur Verfügung gestellt werden. Um eine möglichst gute Diffusion der abzutrennenden Substanz zum Inneren eines porösen Trägers zu gewährleisten und damit eine gute Adsorptionsleistung zu ermöglichen, wird  
5 der Porenquerschnitt groß gewählt, so dass der Stofftransport - insbesondere durch Diffusion - ins Trägerinnere nicht oder nur unwesentlich behindert wird. Üblicherweise betragen die durchschnittlichen Porendurchmesser daher ein Vielfaches der Größe der abzutrennenden Substanz.

Herkömmliche Trennverfahren ermöglichen es jedoch nur mit großem  
10 Aufwand, aus einer Mischung mehrerer chemisch ähnlicher Substanzen eine bestimmte Substanz oder eine bestimmte Gruppe von Substanzen abzutrennen. Dazu werden häufig mit Antikörpern oder deren Bindungsstellen versehene "Perlen" verwendet. Diese sind jedoch aufwendig und verhältnismäßig teuer herzustellen, da zunächst die entsprechenden  
15 Antikörper erzeugt werden müssen. Im übrigen sind sie nur sehr beschränkt geeignet, Nukleinsäuren voneinander zu unterscheiden und selektiv aus einem flüssigen Medium abzutrennen.

Es war daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Trennmittel zum Abtrennen einer Substanz aus einem flüssigen Medium anzugeben. Die  
20 Trennmittel sollten möglichst einfach herstellbar sein, das selektive Abtrennen einer möglichst großen Vielfalt verschiedener Substanzen ermöglichen, sie sollten stabil sein in einer Vielzahl üblicher flüssiger Medien wie Zellkulturmedien und Zellextrakten, und sie sollten einen möglichst hohen Anteil der im Medium vorliegenden abzutrennenden Substanz abtrennen  
25 können. Ferner sollten entsprechende Trennverfahren bzw. Verwendungen der Trennmittel angegeben werden.

Die Aufgabe wird gemäß einem Aspekt gelöst durch Vesikel

- mit einer Membran enthaltend amphiphile Moleküle,
- einer in der Membran enthaltenen porenbildenden Poreneinheit, um  
30 den Zugang zum Vesikel-Inneren zu ermöglichen,

wobei das Vesikel im Vesikel-Inneren eine Bindungssubstanz enthält zum Binden der zu bindenden Substanz, und wobei die Bindungssubstanz im Wesentlichen nicht durch die von der Poreneinheit gebildete Pore diffundieren kann.

5 Durch das Einbringen bzw. Vorsehen einer im Vesikel-Inneren eingeschlossenen Bindungssubstanz wird es erstmals möglich, dauerhaft größere Mengen allein durch chemische Bindung bzw. chemische Wechselwirkungen im Inneren des Vesikels zu binden. Dies ermöglicht es beispielsweise, Nukleinsäuren oder andere geladene Makromoleküle auch bei  
10 geöffneten Poren lange im Inneren eines solchen Vesikels zu halten. Damit eignet sich das erfindungsgemäße Vesikel insbesondere als Trennmittel zum Abtrennen einer Substanz aus einem flüssigen Medium, indem die Bindungssubstanz so ausgewählt wird, dass die abzutrennende Substanz von der Bindungssubstanz gebunden wird, so dass die gebundene Substanz mit  
15 dem Vesikel selbst vom flüssigen Medium abgetrennt werden kann, beispielsweise durch Filtration oder Sedimentation/Zentrifugation. Im Gegensatz zu herkömmlichen porösen Trennmitteln ist den erfindungsgemäßen Vesikeln zudem von vornherein eine Spezifität für solche Substanzen zu eigen, die die von der Poreneinheit gebildete Pore passieren  
20 können und eine Affinität an die Bindungssubstanz haben. Die erfindungsgemäßen Vesikel können daher beispielsweise ähnliche Substanzen wie PCR-Primer oder doppelsträngige PCR-Produkte von größeren Nukleinsäuren wie beispielsweise Plasmid-DNA trennen.

Vorzugsweise enthält die Membran als amphiphiles Molekül ein amphiphiles  
25 Copolymer mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Abschnitt. Insbesondere ist es bevorzugt, wenn die Membran des erfindungsgemäßen Vesikels aus amphiphilen Block-Copolymer-Molekülen gebildet wird, wobei es insbesondere bevorzugt ist, wenn die Membran aus einer einzigen Art von amphiphilen Block-Copolymer-Molekülen gebildet wird.

30 Vesikel aus amphiphilen Block-Copolymeren sind bereits zuvor als Bioreaktoren beschrieben worden (Nardin et al., Eur. Phys. J. E 4, (2001),

403-410, "Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors"; sowie WO 01/32146). Dabei handelt es sich um Vesikel oder Micellen aus aggregierenden Block-Copolymeren mit zumindest einem hydrophilen und einem hydrophoben Abschnitt. Die entstehenden Vesikel/Micellen sind sehr stabil gegenüber Verdünnung, können eine monodisperse Größenverteilung besitzen und weisen eine sehr niedrige Dynamik auf, so dass ihre Halbwertszeit bis zu einigen Stunden betragen kann. Die beschriebenen Bioreaktoren sind jedoch ungeeignet zum Konzentrieren und Abtrennen von Substanzen. Insbesondere können Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht von z.B. mehr als 1000 Da nicht in den Bioreaktor hinein diffundieren. Ferner besitzen die Bioreaktoren keine Mittel, um Substanzen in ihrem Inneren in höherer Konzentration aufzunehmen als in der Lösung. Zudem werden die in den Bioreaktor aufgenommenen Substanzen zu Produkten umgesetzt, die entsprechend einem Konzentrationsgradienten den Bioreaktor wieder verlassen.

Ferner sind Vesikel bekannt, bei denen ein Polymer-Gerüst im Inneren der Membran eines Liposoms durch Polymerisation aufgebaut wird (Hotz und Meier, Langmuir 1998, 14, 1031 – 1036, „Vesicle-Templated Polymer Hollow Spheres“). Diese können auch nach Entzug der zur Polymerisation verwendeten oberflächenaktiven Substanzen im trockenen Zustand stabile Hohlkugeln bilden.

Zur Herstellung und Verarbeitung der Vesikel und insbesondere der in der Vesikel-Membran enthaltenen amphiphilen Copolymere wird der Fachmann insbesondere die oben bezeichneten Veröffentlichungen von C. Nardin et al. (Eur. Phys. J. E 4, (2001), 403-410) sowie die internationale Patentanmeldung WO 01/32146 heranziehen. Die darin beschriebenen Ausführungsformen entsprechender Vesikel-Membranen und der in ihnen enthaltenen amphiphilen Copolymere sind auch erfindungsgemäß besonders bevorzugt.

Insbesondere ist es bevorzugt, wenn das amphiphile Copolymer ein segmentiertes Copolymer ist mit zumindest einem hydrophilen Abschnitt A und zumindest einem hydrophoben Abschnitt B, wobei sich die segmentierten

Copolymere selbst unter Bildung von Vesikeln zusammenlagern können. Das amphiphile Copolymer kann auch mehr als einen hydrophilen und mehr als einen hydrophoben Abschnitt enthalten, insbesondere kann das Copolymer eine ABA-Struktur mit zwei hydrophilen und einem dazwischen angeordneten hydrophoben Abschnitt besitzen. Zur Bildung erfindungsgemäßer Vesikel bevorzugt sind Block-Copolymere, wobei es sich insbesondere um lineare Block-Copolymere handeln kann. Anstelle oder ergänzend zu linearen Block-Copolymeren können jedoch auch gepfropfte Copolymere oder Kammstrukturen verwendet werden, die sowohl (zumindest) einen hydrophilen als auch (zumindest) einen hydrophoben Abschnitt besitzen.

Wird ein ABA-Copolymer zum Bilden eines erfindungsgemäßen Vesikels verwendet, dann bildet sich ein Vesikel mit einer hydrophilen Innen- und Außenschicht sowie einer hydrophoben Zwischenschicht. Wird ein BAB-Copolymer verwendet, so bildet sich ein Vesikel mit hydrophober Innen- und Außenschicht sowie einer hydrophilen Zwischenschicht. Weitere bevorzugte Copolymere und deren Verwendungsmöglichkeiten zum Bilden von Vesikeln können insbesondere der WO 01/32146 entnommen werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vesikel enthält die Membran mehrere der amphiphilen Copolymere, wobei die amphiphilen Copolymere miteinander kovalent verbunden sind. Die Copolymere können insbesondere durch Polymerisation miteinander verbunden werden. Beispiele solcher erfindungsgemäß bevorzugten Copolymere und daraus gebildete Vesikel-Membranen sind ebenfalls der WO 01/32146 bzw. der genannten Veröffentlichung von C. Nardin et al. zu entnehmen.

Dementsprechend besonders bevorzugt enthält die Membran ein Poly-(2-methyloxazolin)-Block-Poly (dimethylsiloxan)-Block-Poly (2-methyl-oxazolin)-Triblock-Copolymer (PMOXA-PDMS-PMOXA), vorzugsweise mit einer oder mehreren polymerisierbaren Gruppen an beiden Kettenenden, wie auch in Beispiel 1 der WO 01/32146 beschrieben. Dieses Copolymer ist besonders

geeignet zur Bildung stabiler Vesikel und erleichtert den Einbau einer porenbildenden Poreneinheit in die Membran.

Es ist nicht notwendig, dass die Membran des erfindungsgemäßen Vesikels lediglich aus amphiphilen Copolymeren einer einzigen Art aufgebaut ist.

5 Insbesondere kann die Membran außer PMOXA-PDMS-PMOXA-Triblock-Copolymeren noch weitere Arten amphiphiler Copolymere enthalten.

Die Bindungssubstanz bindet an die zu bindende Substanz über eine chemische Bindung, also unter Ausbildung einer Hauptvalenzbindung - beispielsweise einer kovalenten Bindung oder einer ionischen Bindung -, einer  
10 Nebervalenzbindung - beispielsweise eine Van der Waals-Wechselwirkung und/oder eine Wasserstoffbrückenbindung -, und/oder durch eine hydrophile oder hydrophobe Wechselwirkung. Besonders bevorzugt ist es, wenn die Bindungssubstanz eingerichtet ist zum Ausbilden einer oder mehrerer Wasserstoffbrücken, Ionenbindungen und/oder zur hydrophoben  
15 Wechselwirkung mit der zu bindenden Substanz. Diese Bindungsarten ermöglichen ein spezifisches Binden an zahlreiche in der biochemischen Praxis relevante Substanzen; sie ermöglichen es außerdem, die gebundene Substanz mit einfachen Mitteln wieder von der Bindungssubstanz zu lösen. In besonders bevorzugten Ausführungsformen sind die erfindungsgemäßen  
20 Vesikel eingerichtet, um die abzutrennende Substanz in ihrem Inneren im Vergleich zu einer umgebenden Lösung anzureichern.

Die im Vesikel-Inneren enthaltene Bindungssubstanz ist vorzugsweise ein Polyelektrolyt. Dabei ist es bevorzugt, als Bindungssubstanz eine Polysäure zu verwenden, wenn das Vesikel-Innere eine oder mehrere positiv geladene  
25 Substanzen binden soll. Beispiele geeigneter Polysäuren sind Polyphosphorsäure, Polyvinylschwefelsäure, Polyvinylsulfonsäure, Polyvinylphosphonsäure und Polyacrylsäure. Soll das Vesikel-Innere jedoch eine oder mehrere negativ geladene Substanzen binden, so ist dieses vorzugsweise einer Polybase ausgerüstet, beispielsweise Polyethylenimin,  
30 Polyvinylamin, Polyvinylpyridin und/oder Polylysin.



Ergänzend oder alternativ dazu kann die Bindungssubstanz auch eine Oligosäure bzw. eine Oligobase aus 10 – 100 Säure- bzw. Basegrundeinheiten sein. Der Fachmann kann entsprechende Oligo- und Polysäuren bzw. -basen insbesondere danach auswählen, ob sie durch eine Pore der porenbildenden Einheit hindurch diffundieren kann, wobei es zweckmäßig ist, solche Bindungssubstanzen auszuwählen, die zu einer solchen Diffusion nur in sehr geringem Maße in der Lage sind.

Ergänzend oder alternativ zur Verwendung von Polysäuren bzw. Oligosäuren bzw. -basen kann im Vesikel-Innere eine Affinität für die zu bindende Substanz auch durch eine nach der Vesikelbildung erfolgende Reaktion unter Knüpfung und/oder Auflösung einer kovalenten Bindung von in der Vesikel-Membran enthaltenen Einheiten gebildet werden.

Zudem ist es besonders bevorzugt, wenn das Vesikel-Innere im wesentlichen hohl ist. Dies ermöglicht es, im wesentlichen das gesamte von der Vesikel-Membran umschlossene Volumen für das Binden der zu bindenden Substanz zu nutzen. Darüber hinaus wird durch die Vesikel-Membran eine gebundene Substanz geschützt; beispielsweise können Proteasen aus einem umgebenden Medium nicht mehr in das Vesikel-Innere gelangen.

Ebenfalls besonders bevorzugt ist es, wenn die Vesikel-Membran auf ihrer Außenseite frei ist von der Bindungssubstanz. Die zu bindende Substanz wird dann hauptsächlich über die im Vesikel-Inneren vorliegende Bindungssubstanz gebunden; dies ermöglicht es, die durch die Poreneinheit erzielbare besonders gute Spezifität zum Unterscheiden ähnlicher Substanzen (beispielsweise kurzer PCR-Produkte von großen Plasmiden) zu nutzen.

Die Poreneinheit ist vorzugsweise eingerichtet, die Permeation von Substanzen (vorzugsweise insbesondere der zu bindenden Substanz) in das Vesikel-Innere zu regulieren.

Besonders bevorzugt sind solche Vesikel, deren Poreneinheit ein Protein oder einen Proteinteil enthält, das/der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) einem porenbildenden Transmembranprotein,
- b) einem porenbildenden Transmembranprotein mit einer alpha-helikalen Transmembran-Struktur, insbesondere Alamethicin, Melittin, Magainin, Dermaseptin,
- 5 c) einem porenbildenden Transmembranprotein mit einer  $\beta$ -Fass-Transmembran-Struktur, insbesondere *Rhodobacter capsulatus*-Porin, *Rhodopseudomonas blastica*-Porin, Omp, ScrY, FepA, PhoE sowie insbesondere für Substanzen mit einem Molekulargewicht  $\leq 1000$  Da OmpF, LamB, OmpK36 und für Substanzen mit einem Molekulargewicht  
10 > 1000 Da FhuA, TolC, Maltoporin und alpha-Hämolysin,
- d) einer Transmembran-Struktur eines porenbildenden Transmembran-proteins, und
- e) einem Protein, dass eine zu einer porenbildenden Transmembranstruktur eines der Proteine gemäß a), b), c) und/oder d) strukturhomologe Struktur  
15 besitzt.

Nähere Informationen zu den soeben aufgezählten Proteinen entnimmt der Fachmann den entsprechenden Veröffentlichungen von Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., 3. Aufl., 1994, S. 485-498 nebst weiteren Nachweisen; Biggin PC und Sansom MS, Biophys. Chem.  
20 1999, 76(3): 161-183; Pawlak et al., Protein Sci. 1994, 3(10): 1788-1805, Template assembled melittin: structural and functional characterization of a designed, synthetic channel-forming protein; Sakai N und Matile S, Chem Commun (Camb.) 2003, (20): 2514-2523, Synthetic multifunctional pores: lessons from rigid-rod beta barrels; Weiss et al., FEBS Lett. 280 (1991), The  
25 structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution; Kreusch et al., Protein Sci. 3 (1994): 58-63, Structure of the membrane channel porin from *Rhodopseudomonas blastica* at 2.0 Å resolution; Cowan et al., Nature 358 (1992): 727-733, Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins; Dutzler et al., Struct. Fold. Des. 7 (1999): 425-434, Crystal  
30 structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of

*Klebsiella pneumoniae*; Zeth et al., Structure Fold Des. 8 (2000): 981-992, Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution; Schirmer et al., Science 267 (1995): 512-514, Structural basis for sugar  
5 translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution; Danelon et al., J Biol Chem. 2003, 278(37): 35542-35551, Probing the orientation of reconstituted maltoporin channels at the single-protein level; Forst et al., Nat. Struct. Biol. 5 (1998): 37-46, Structure of the sucrose-specific porin ScrY from  
10 *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose; Buchanan et al., Nat. Struct. Biol. 6 (1999): 56-63, Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*; Fergusson et al., Science 282 (1998): 2215-2220, Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide; Locher et al., Cell 95 (1998): 771-778, Transmembrane signalling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal  
15 structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes; Koronakis et al. und Song et al. wie oben angegeben.

Dabei wird eine Struktur als strukturhomolog zu einer Ausgangsstruktur angesehen, wenn sie ebenso wie die Ausgangsstruktur das Bilden einer Pore in einer Vesikel-Membran ermöglicht.

20 Die Permeation von Substanzen in das Vesikel-Innere wird in bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung durch die Poreneinheit insbesondere dadurch reguliert, dass die Poreneinheit Substanzen mit einer vorgewählten Mindest- und/oder Höchstgröße und/oder einer vorgewählten Mindest- und/oder Höchstladungsdichte den Durchtritt durch die Vesikel-Membran  
25 ermöglicht. Durch die Verwendung einer Poreneinheit wird es auf vorteilhaft einfache Weise ermöglicht, eine gleichbleibende, vorwählbare Porengröße einzustellen sowie die zum sonstigen Regulieren der Permeation notwendigen Poreneigenschaften (insbesondere Ladungsverteilungen) gleichbleibend und vorwählbar bereitzustellen und mittels molekularbiologischer Methoden (z.B. Mutagenese) gezielt zu verändern, um beispielsweise Selektivitäten und  
30 Transporteigenschaften zu ändern.

In bevorzugten Vesikeln enthält die Poreneinheit ein Protein oder einen Proteinteil, das/der eine  $\beta$ -Fass-Struktur enthält. Eine  $\beta$ -Fass-Struktur tritt sehr häufig in integralen Membranproteinen auf. Sie ist insbesondere ein häufiges Merkmal von Proteinen, die am Stofftransport durch die äußere bakterielle Membran beteiligt sind. Besonders gut charakterisiert und erfindungsgemäß als Poreneinheit bevorzugt sind Porine bzw. deren jeweilige  $\beta$ -Fass-Domäne oder deren  $\beta$ -Fass-Struktur.

Die Poreneinheit muss nicht ausschließlich aus einem Protein bestehen, sondern kann auch aus zwei oder mehr Proteineinheiten gebildet werden, die zusammenwirken, um eine Pore zu bilden. Vorzugsweise bilden die Teilproteine in der Poreneinheit eine die Membran durchdringende Wand mit insgesamt gesehen einer  $\beta$ -Fass-Struktur. Beispiele solcher ebenfalls bevorzugter Poreneinheiten, deren  $\beta$ -Fass-Struktur aus dem Zusammenwirken mehrere Proteineinheiten hervorgeht, sind das trimere TolC-Protein aus *E. coli* und das heptamere Haemolysin-Toxin der Staphylokokken (s. Koronakis et al.; Nature 405 (2000): 914-919; Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export, bzw. Song et al., Science 274 (1996): 1859-1866, Structure of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin, a heptameric transmembrane pore). Soweit im Rahmen des vorliegenden Textes von einer  $\beta$ -Fass-Struktur gesprochen wird, wird darunter auch immer ein solcher Abschnitt eines Proteins verstanden, der, wenn er mit geeigneten weiteren Abschnitten gegebenenfalls weiterer Proteine zusammentritt, in einer Membran eines erfindungsgemäßen Vesikels eine Pore mit  $\beta$ -Fass-Struktur bildet.

Eine besonders bevorzugte Poreneinheit ist das FhuA-Kanalprotein bzw. ein Protein mit dessen  $\beta$ -Fass-Domäne oder mit einer zu dieser strukturhomologen Struktur. Dieses Protein ist sehr temperaturstabil (bis ca. 60° C), es erlaubt den Transport von Phagen-DNA in das Vesikel-Innere und ist in üblichen Wirtszellen exprimierbar, beispielsweise in *E. coli*. Das Protein besitzt einen im Wesentlichen elliptischen Porendurchmesser von 4,6 nm zu

3,9 nm. Die  $\beta$ -Fass-Domäne wird dabei von 22 antiparallelen Faltblättern gebildet.

Ein Beispiel eines Proteins mit der  $\beta$ -Fass-Struktur von FhuA ist ein FhuA-Derivat, das hervorgegangen ist durch Entfernen der Aminosäuren 5 – 160 von FhuA (s. Braun et al., Eur. J. Biochem. 269 (2002): 4948-4959, Diffusion through channel derivatives of the *Escherichia coli* FhuA transport protein). Dieses FhuA-Derivat ist als Poreneinheit besonders bevorzugt. Es bildet eine Pore mit einem Innendurchmesser, der an der engsten Stelle etwa 1 nm breit ist. Durch geeigneten Aminosäureaustausch kann diese Porenweite verengt, erweitert oder die Pore auf ihrer Poren-Innenseite mit Ladungen versehen werden.

Ferner ist es bevorzugt, wenn die Poreneinheit einen inneren Porendurchmesser von mehr als 0,1 nm, vorzugsweise mindestens 1 nm und besonders bevorzugt mindestens 3,5 nm Breite besitzt. Poreneinheiten mit entsprechenden Porendurchmessern lassen sich besonders leicht anhand von  $\beta$ -Fass-Strukturen bekannter Proteine erzeugen, wie soeben am besonders bevorzugten Beispiel des FhuA-Proteins dargestellt. Zudem ermöglichen entsprechende Poreneinheiten nicht nur kleinen Atomen und Molekülen den Zutritt ins Innere der erfindungsgemäßen Vesikel, sondern auch größeren Molekülen, insbesondere Nukleinsäuren wie DNA und RNA. Entsprechende Poreneinheiten werden daher erfindungsgemäß bevorzugt verwendet zum Abtrennen einer Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und/oder einer RNA.

Ferner ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn die Poreneinheit einen inneren Porendurchmesser von nicht mehr als 10 nm Breite, vorzugsweise nicht mehr als 8 nm und besonders bevorzugt nicht mehr als 5 nm Breite besitzt. Die Poreneinheit erlaubt so auf vorteilhaft einfache Weise, die erfindungsgemäßen Vesikel nach Art eines Siebes zu verwenden und die Substanzen, die ins Vesikel-Innere gelangen können, anhand ihrer Breite auszuwählen.

Sollen Nukleinsäuren, insbesondere einzel- und/oder doppelsträngige DNA bzw. RNA in dem erfindungsgemäßen Vesikel aufgenommen werden, so beträgt der Porendurchmesser vorzugsweise zumindest 1 nm und nicht mehr als 5 nm.

5 Ferner sind erfindungsgemäß besonders solche Vesikel bevorzugt, die im Vesikel-Inneren ein positiv geladenes Oligomer und/oder Polymer besitzen. Beispiele entsprechender Oligomere und Polymere sind bereits weiter oben beschrieben worden. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind dabei  
10 solche Vesikel, die im Vesikel-Inneren Polylysin enthalten. Mit entsprechenden Oligomeren und Polymeren, insbesondere mit Polylysin, können sehr einfach erfindungsgemäße Vesikel gebildet werden, die sich besonders eignen zur Aufnahme und zum Binden von Nukleinsäuren, insbesondere einzel- und doppelsträngiger DNA bzw. RNA im Vesikel-Inneren. Dabei wird zweckmäßigerweise im Vesikel-Inneren eine ausreichend  
15 hohe Konzentration des positiv geladenen Oligo- und/oder Polymers bereitgestellt (insbesondere an Polylysin), um ein sicheres Festhalten der im Vesikel aufzunehmenden Nukleinsäure (insbesondere einzel- und/oder doppelsträngiger DNA oder RNA) zu gewährleisten.

Demgemäß ist es ferner bevorzugt, erfindungsgemäße Vesikel zum Binden  
20 einer geladenen Substanz zu verwenden. Aufgrund ihrer besonderen, oben beschriebenen Struktur sind erfindungsgemäße Vesikel besonders geeignet, eine oder mehrere elektrisch geladene Substanzen in ihrem Inneren aufzunehmen. Durch Verwendung geeigneter, beispielsweise eine Potentialdifferenz hervorrufende Substanzen können die erfindungsgemäßen  
25 Vesikel besonders gut zum Festhalten und Binden einer oder mehrerer elektrisch geladener Substanzen in ihrem Inneren verwendet werden. Durch eine geeignete Auswahl eines Porenbildners können die erfindungsgemäßen Vesikel zudem dazu verwendet werden, aus einer Mischung unterschiedlicher elektrisch geladener Substanzen nur solche mit einer vorgewählten  
30 Höchstgröße aufzunehmen und gegebenenfalls zu binden. Besonders geeignete Porenbildner wurden oben bereits beschrieben; besonders

bevorzugt ist ein FhuA-Protein bzw. ein Protein mit der  $\beta$ -Fass-Domäne von FhuA als Porenbildner in einem erfindungsgemäßen Vesikel zum Aufnehmen und gegebenenfalls zum Binden einer elektrisch geladenen Substanz.

Es ist ebenfalls bevorzugt, als Poreneinheit ein Protein bzw. Teilprotein einer  
5 der oben beschriebenen Arten auszuwählen, die im Poreninneren eine positive oder eine negative Nettoladung besitzt. Eine solche Pore ermöglicht es, den Durchtritt durch die Pore für solche Substanzen zu erleichtern, die eine entgegengesetzte Ladung besitzen, bzw. für solche Substanzen zu erschweren, die die gleiche Ladung besitzen. Insbesondere kann auf diese  
10 Weise eine geladene Bindungssubstanz auch dann im Vesikel-Inneren festgehalten werden, wenn diese allein aufgrund ihrer Größe ansonsten durch die vom Porenbildner gebildete Pore hindurchdiffundieren könnte.

Zudem ist es bevorzugt, wenn die Poreneinheit eine enantioselektive Pore bildet. Ein Beispiel für eine enantioselektiven Poreneinheit ist Maltoporin  
15 (Danelon et al., s.o.). Darüber hinaus können durch Einbauen geeigneter Aminosäuren auch zuvor nicht enantioselektive Transmembranproteine bzw. deren Transmembran-Strukturen enantioselektiv gemacht werden. Ferner ist zu erwarten, dass weitere enantioselektive Transmembranproteine gefunden werden. Die Verwendung eines enantioselektiven Transmembranproteins  
20 bzw. einer enantiomeren Transmembran-Suktur in einer Poreneinheit (bzw. als Poreneinheit) eines Vesikels mit einer Membran enthaltend amphiphile Copolymere ist ebenfalls bevorzugt.

Ferner ist es besonders bevorzugt, wenn die im Vesikel aufzunehmende und/oder zu bindende Substanz eine Nukleinsäure ist. Die  
25 erfindungsgemäßen Vesikel ermöglichen es bei einer geeigneten Wahl der Poreneinheit, Nukleinsäuren auf einfache Weise und mit hoher Effizienz aus flüssigen Mischungen abzutrennen, insbesondere von Proteinen.

Die Ladungen im Inneren der erfindungsgemäßen Vesikel können in bevorzugten Ausführungsformen insbesondere über den pH-Wert, über die

Salzkonzentration oder die Anzahl der ionischen Gruppen in den Vesikeln moduliert und an vielfältige Problemstellungen angepasst werden.

Aus den erfindungsgemäßen Vesikeln können die darin aufgenommenen und/oder darin gebundenen Substanzen durch a) mechanisches Zerstören der  
5 Vesikel, beispielsweise durch Anlegen einer Scherkraft, b) durch Auflösen der Vesikel, beispielsweise in Ethanol, und/oder c) durch Zugabe eines Salzes, beispielsweise NaCl, wieder herausgelöst werden.

Dementsprechend bevorzugt ist es, die erfindungsgemäßen Vesikel zum Aufnehmen und/oder zum Binden einer Nukleinsäure zu verwenden. Eine  
10 solche Verwendung der erfindungsgemäßen Vesikel erlaubt insbesondere ein schnelles Abtrennen einer Nukleinsäure aus einer Mischung enthaltend weitere geladene Substanzen, beispielsweise Proteine. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Vesikel zu diesem Zweck ermöglicht es ebenfalls, Nukleinsäuren mit hoher Ausbeute aus entsprechenden Mischungen zu  
15 gewinnen. Zudem wird für die Nukleinsäure-Gewinnung in besonders bevorzugten Ausführungsformen keine Agarose benötigt und schließlich fallen bei der erfindungsgemäßen Verwendung nur geringe Mengen an Abfällen an, wobei weitgehend auf kanzerogene Reagenzien verzichtet werden kann.

Es ist deshalb auch ein Verfahren zum Abtrennen einer Nukleinsäure aus  
20 einer nukleinsäurehaltigen Lösung bevorzugt, umfassend das Inkontaktbringen der abzutrennenden Nukleinsäure mit einem erfindungsgemäßen Vesikel wie oben beschrieben. Dabei ist es zweckmäßig, erfindungsgemäße Vesikel zu verwenden, die im Vesikel-Inneren ein positiv geladenes Oligomer und/oder Polymer besitzen. Besonders bevorzugt ist es,  
25 polylysinhaltige Vesikel zu verwenden. Die Porengröße der verwendeten erfindungsgemäßen Vesikel beträgt in bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens 1 – 5 nm; wobei als Poreneinheit besonders bevorzugt ein FhuA-Derivat ist, dem im Vergleich zum nativen FhuA-Protein die Aminosäuren 5 – 160 fehlen.



Das erfindungsgemäße Verfahren, insbesondere unter Verwendung der soeben beschriebenen bevorzugten erfindungsgemäßen Vesikel einschließlich der besonders bevorzugten Poreneinheiten, ermöglicht es auch, Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe voneinander zu trennen.

5 Beispielsweise können große Nukleinsäuren wie Plasmid-DNA bei entsprechender Auswahl der Poreneinheit (insbesondere einer Poreneinheit mit einer  $\beta$ -Fass-Struktur, die strukturhomolog ist zu der von FhuA) aufgrund ihrer Breite nicht ins Innere der erfindungsgemäßen Vesikel gelangen, während dies für kürzere, nicht zirkuläre und insbesondere einzelsträngige

10 Nukleinsäuren möglich ist. Aufgrund dieser Siebwirkung der Poreneinheit können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zudem Nukleinsäuren schnell und mit hoher Ausbeute von Proteinen abgetrennt werden.

Durch entsprechendes Einstellen der Salzkonzentration und des pH-Wertes kann zudem ein dauerhaftes Binden kurzer einzelsträngiger Nukleinsäuren im

15 Inneren der erfindungsgemäßen Vesikel verhindert werden.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zum Abtrennen einer Nukleinsäure umfasst die Schritte:

- a) Inkontaktbringen einer die abzutrennende Nukleinsäure enthaltenden Lösung mit einem erfindungsgemäßen Vesikel wie oben beschrieben, das vorzugsweise Polylysin enthält und dessen Membran einen Porenbildner enthaltend die  $\beta$ -Fass-Domäne eines FhuA-Proteins enthält;
- b) Eindringenlassen der abzutrennenden Nukleinsäure ins Innere des Vesikels; dies kann insbesondere bei Raumtemperatur geschehen;
- 25 c) Abtrennen der erfindungsgemäßen Vesikel von der die abzutrennende Nukleinsäure ursprüngliche enthaltenden Lösung; dies kann beispielsweise durch Zentrifugation und/oder Filtration geschehen;
- d) Einstellen der Salzkonzentration, um Nukleinsäuren aus dem erfindungsgemäßen Vesikel abzutrennen, die eine geringere Größe

als die abzutrennende Nukleinsäure besitzen (beispielsweise PCR-Primer), und Abtrennen der so freigesetzten Nukleinsäuren; und

- e) Freisetzen der abgetrennten Nukleinsäure durch
- a. Zerstören des Vesikels durch Anlegen einer Scherkraft,
  - 5 b. Auflösen des Vesikels durch Ethanolzugabe und/oder
  - c. durch Zugabe hoher NaCl-Konzentrationen und  
anschließendem Entfernen der Salze über eine herkömmliche  
Chromatographie-Säule.

Ein solches Verfahren kann innerhalb von 30 – 45 Minuten und damit im  
10 Vergleich zu herkömmlichen Verfahren ungewöhnlich schnell abgeschlossen werden.

Die Verwendung einer Poreneinheit nach einer der zuvor beschriebenen Arten zum Bilden einer Pore in einem Vesikel, dessen Membran ein amphiphiles Copolymer wie oben beschrieben enthält, ist ebenfalls erfindungsgemäß  
15 bevorzugt.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden nachfolgend anhand der Figur sowie der beigefügten Beispiele weiter erläutert. Es stellen dar:

Fig. 1 Schematische Darstellung der Struktur eines erfindungsgemäßen Vesikels;

20 Fig. 2 Fluoreszenzmessung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold zu den Vesikeln mit und ohne DNA, s. Beispiel 3 Verfahren 1;

Fig. 3 Fluoreszenzmessung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold zu den Vesikeln mit und ohne DNA, s. Beispiel 3  
25 Verfahren 1;

Fig. 4 Fluoreszenzmessung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold zu den Vesikeln mit und ohne DNA, s. Beispiel 3. Verfahren 2;

Fig. 5 Fluoreszenzmessung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold zu den Vesikeln mit und ohne DNA, s. Beispiel 3. Verfahren 3; und

Fig. 6 Fluoreszenzmessung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold zu den Vesikeln mit und ohne DNA, direktes Auflösen.

In Fig. 1 ist schematisch der Aufbau und die Wirkungsweise eines erfindungsgemäßen Vesikels zum Abtrennen einer geladenen Substanz dargestellt. Das Vesikel 1 besitzt eine Membran 10 aus PMOXA-PDMS-PMOXA Triblock-Copolymer. Das Vesikel 2 ist im wesentlichen kugelförmig und besitzt ein Vesikel-Innere 5. Das Vesikel-Innere 5 ist frei von Feststoffen.

In der Membran 10 sind vier Poreneinheiten 20 enthalten, die jeweils einen Kanal zum Eintretenlassen einer Substanz (Pfeile) ins Vesikel-Innere 5 bilden. Die Poreneinheiten 20 sind FhuA<sub>tr</sub>-Proteine.

Auf der Innenseite 12 der Membran 10 ist ein Polyelektrolyt 15 angeordnet. Der Polyelektrolyt 15 hat eine zum Binden der geladenen Substanz geeignete Ladung. Wenn die zu bindende Substanz eine Nukleinsäure ist, dann ist der Polyelektrolyt vorzugsweise Polylysine.

Die geladene Substanz dringt durch eine Pore 20 in der Membran 10 des Vesikels 1 in das Vesikel-Innere 5 ein. Dort bindet sie an den Polyelektrolyten 15.

Zum Abgeben der geladenen Substanz aus dem Vesikel 1 wird das Vesikel 1 durch Anlegen einer Scherkraft (nicht dargestellt) zerstört. Das Vesikel 1 kann auch durch Ethanolzugabe aufgelöst und die gebundene Substanz auf diese Weise freigesetzt werden. Ein dritter Weg zum Freisetzen der gebundenen Substanz ist die Zugabe geeigneter Ionen, so dass die geladene Substanz

vom Polyelektrolyten 15 gelöst wird. Die beiden letztgenannten Verfahren vermeiden es, die gebundene Substanz einer starken mechanischen Beanspruchung auszusetzen.

Beispiel 1: Herstellung von FhuA<sub>tr</sub>:

- 5 Bakterienstamm und Wachstumsbedingungen: Es werden der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die Zellen werden bei 37 °C in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) unter Schütteln mit 200 rpm gezüchtet. Es wird Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und die optische Dichte bei 578 nm überwacht. Wenn die optische Dichte bei 578 nm  
10 einen Wert von 0,9-1 erreicht, wird Anhydrotetracyclin (200 µg/l Zellkultur) zugegeben, um den tet-Promotor auf dem in den Bakterien enthaltenen Plasmid zu induzieren. Die Zellen werden weitere 3 h (3 Stunden) inkubiert.

- Plasmid: Das verwendete Plasmid ist pFHUA, ein pASK-IBA3-Derivat (IBA-Labortechnik, Göttingen). Das Wildtyp-Gen wurde erhalten vom Biozentrum  
15 Basel (Braun, M., Killmann, H., and Braun, V., The  $\beta$ -barrel domain of FhuA $\Delta$ 5-160 is sufficient for TonB-dependent FhuA activities of *Escherichia coli*, Mol. Microbiol. (1998)). Eine EcoRI-Restriktionsstelle wird im Wildtyp-Gen an der Aminosäureposition 129 (FhuA  $\Delta$ 1-129) und an der Aminosäureposition 160 (FhuA  $\Delta$ 1-160) eingebaut. Eine XhoI-  
20 Restriktionsstelle wurde in beiden Fällen an den Enden der Gene eingebaut mit Hilfe der PCR-Primer SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 2. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und mit QIAQuick-Kits (Qiagen) aufgereinigt, mit EcoRI (New England Biolabs) und XhoI (New England Biolabs) verdaut, erneut über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und  
25 mit dem linearisierten pASK-IBA3-Plasmid (geschnitten mit EcoRI und XhoI) ligiert und durch Standard-Kloniervverfahren in DH5 $\alpha$  transformiert.

Tabelle 1: PCR-Mischung für FhuA<sub>tr</sub>:

Substanz	Volumen (µl)
ddH <sub>2</sub> O	83.4
10x Puffer(Taq Puffer)	10
DNTP(10mM)	2
Primer SEQ ID NO 1(20 mM)	1.3
Primer SEQ ID NO 2(20mM)	1.3
Plasmid mit FhuA (Wildtyp-Gen)	1
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	1
Summe	100

Tabelle 2: PCR-Bedingungen

Temperatur (°C)	Dauer (min)	Anzahl Zyklen
94	3	1
94	1	31
68	1	31
72	3	31
72	10	1
8	unbegrenzt	1

5 Tabelle 3: Verdau des Plasmids pASK-IBA3

Substanz	Volumen (µl)
ddH <sub>2</sub> O	68.16
10x Puffer (NEB Buffer 2)	10

Plasmid pASK-IBA3	20
EcoR I (20U)	0.42
Xho I (20U)	0.42
BSA	1
Summe	100

Tabelle 4: Verdau des PCR-Produkts

Substanz	Volumen (µl)
ddH <sub>2</sub> O	16
10x Puffer (NEB Buffer 2)	10
PCR Product	70
EcoR I (20U)	2
Xho I (20U)	2
Summe	100

Tabelle 5: Verdau-Bedingungen

Temperatur	Dauer
37°C (XhoI)	4h
37°C (EcoRI)	4h

5

Tabelle 6: Ligation von FhuA<sub>tr</sub> in pASK-IBA3, um pFHUA zu erhalten

Substanz	Volumen (µl)
ddH <sub>2</sub> O	5
10x Puffer (Ligase-Puffer)	2.5

Plasmid pASK-IBA3	4
Insert (FhuA <sub>tr</sub> )	12
Ligase (T4 DNA Ligase)	1.5
Summe	25

Extraktion und Isolierung von FhuA<sub>tr</sub>: Nach Überexpression von FhuA wurden die DH5 $\alpha$ -Zellen geerntet und 10 min lang bei 2800 Upm, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu 1 g des Zellpellets wird 5 ml Lysepuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA und DNase I, pH 7,5) zugegeben. Die Mischung wird zweimal mit einer French Press behandelt. Das Lysat wird 10 min lang bei 7000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird in einer Ultrazentrifuge bei 18 °C, 30000 Upm 40 min lang abzentrifugiert.

Das dabei entstehende Pellet wird in 20 ml Vorextraktionspuffer 1 (20 mM Na-Phosphatpuffer, 0.3% octyl-POE (n-Octyl-oligo-oxyethylen, Alexis) aufgelöst und homogenisiert, wobei zuerst ein Mixer verwendet wird und anschließend das Detergens zugegeben wird. Die Mischung wird 50 min lang bei 40 °C inkubiert und anschließend wie zuvor beschrieben in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Das dabei entstehende Pellet wird in 20 ml Vorextraktionspuffer 2 (20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5), 0.5% octyl-POE) aufgelöst und homogenisiert, wobei zuerst ein Mixer verwendet wird und anschließend das Detergens zugegeben wird. Die Mischung wird 50 min lang bei 40 °C inkubiert und anschließend wie zuvor beschrieben in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Das entstehende Pellet wird mit 20 ml Extraktionspuffer (20mM Na-Phosphatpuffer, 3% octyl-POE) versetzt und 40-60 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Ultrazentrifugation wie zuvor beschrieben erhält man FhuA im Überstand. Die Probe von FhuA wird auf einem SDS-Gel analysiert. Das FhuA

wird durch Dialyse gegen 1 Vol.-% octyl-POE in Na-Phosphatpuffer pH 7,5 gewonnen und kann in dieser Form gelagert werden.

#### Beispiel 2: Herstellen erfindungsgemäßer Vesikel

##### Beispiel 2.1: Direktes Auflösen

5 50 mg des ABA (PMOXA-PDMS-PMOXA) Triblock-Copolymers (Nardin, C., Widmer, J., Winterhalter, M., and Meier, W., Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors, Eur. Phys. J. (2001)) wurden in 4,95 ml PBS (0,37M NaCl, 27mM KCl, 43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8H<sub>2</sub>O, 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, pH 7,3) aufgelöst und über Nacht gerührt, um selbstorganisierte Vesikel zu bilden.  
10 Diese wurden dreimal extrudiert mit einem 0,4 µm -Filter (Millipore), um Vesikel einheitlicher Größe zu erhalten.

Um die Membranen der Vesikel zur Aufnahme von FhuA bereit zu machen, wird Triton X-100 (5% Endkonzentration) zugefügt. Etwa 80 µl FhuA werden zu der Mischung zugegeben und 3 h lang inkubiert. Detergenzien können die  
15 Vesikel destabilisieren, deshalb wurden zum Abtrennen des Detergens Bio-beads (Rigaud, J.L., Paternostre, M.T., and Bluzat, A., Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin, Biochemistry (1988)) verwendet und 5-6 h lang unter  
20 langsamem Rühren inkubiert. Proben werden durch Sepharose 4B aufgereinigt, um nicht-rekonstituiertes FhuA und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die Vesikel werden durch centricon YM-30 (Millipore) aufgereinigt.

##### Beispiel 2.2: Ethanol-Verfahren

50 mg des ABA (PMOXA-PDMS-PMOXA) Triblock-Copolymers wurden in  
25 250 µl Ethanol (99,8%) einige Minuten lang aufgelöst, um eine klare Lösung zu erhalten. Von oben wird die Lösung tropfenweise in 4,95 ml PBS (0,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 H<sub>2</sub>O, 14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, pH 7,3) zugegeben. Gleichzeitig werden 80 µl FhuA-Lösung langsam zugegeben. Die Mischung wird 3-4 h lang gerührt. Dreimal wurde extrudiert mit einem 0,4 µm-



Filter (Millipore), um Vesikel einheitlicher Größe zu erhalten. Um das Detergens abzutrennen werden Bio-beads wie in Beispiel 2.1 verwendet, das übrige Verfahren verläuft wie in Beispiel 2.1.

### Beispiel 3: Herstellen von DNA-bindenden Vesikeln

- 5 50 mg des ABA (PMOXA-PDMS-PMOXA) Triblock-Copolymers werden in 4,95 ml Polylysin-Lösung (0,5 mg/ml der Polylysin-Lösung; Mol.-Gewicht 15000-30000 Sigma in 5 ml PBS) aufgelöst und wie in Beispiel 2.1 oder 2.2 beschrieben weiterbehandelt.

- 10 Nach dem Konzentrieren durch centricon YM-30 (Millipore) wurde zu der Suspension 50 µl DNA (60mer, 20 pmol) zugegeben und bei Raumtemperatur 30 min lang inkubiert.

Drei weitere Verfahren wurden entwickelt, um DNA abzutrennen, die nicht in den erfindungsgemäßen Vesikeln gebunden war:

#### Verfahren 1:

- 15 Die Suspension wurde sechsmal mit centricon YM-30 (Millipore) und PBS konzentriert und wieder verdünnt. Nach diesen wiederholten Konzentrierungs- und Waschschritten wurde 1 ml als Probe weiterverwendet und der Gehalt an in Vesikeln eingeschlossener DNA durch Zugabe von 60 µl SYBR Gold (1x Färben; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt (s. Fig. 2, 3).

#### 20 Verfahren 2:

- In diesem Verfahren wurden Qiagen-Reinigungskits (Qia Miniprep, Qiaquick) verwendet, um die DNA innerhalb der Vesikel von der außerhalb der Vesikel abzutrennen. Die eluierte Lösung mit den Vesikeln wurde zentrifugiert (3000 g, 2 min) und der Gehalt an in Vesikeln eingeschlossener DNA durch  
25 Zugabe von 60 µl SYBR Gold (1x Färben; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt (s. Fig. 4).

Verfahren 3:

Zum Entfernen ungebundener DNA, die nicht in die Vesikel eingedrungen war, wurde zusätzlich eine Sepharose 4B-Säule verwendet. Der Gehalt an in Vesikeln eingeschlossener DNA wurde durch Zugabe von 60 µl SYBR Gold (1x Färben; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt (s. Fig. 5, 6).

5

Ansprüche

1. Vesikel zum Binden einer Substanz
  - mit einer Membran enthaltend amphiphile Moleküle,
  - 5 - einer in der Membran enthaltenen porenbildenden Poreneinheit, um den Zugang zum Vesikel-Inneren zu ermöglichen, dadurch gekennzeichnet, dass das Vesikel im Vesikel-Inneren eine Bindungssubstanz enthält zum Binden der zu bindenden Substanz, und wobei die Bindungssubstanz im Wesentlichen nicht durch die von der Poreneinheit gebildete Pore diffundieren kann.
- 10 2. Vesikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindungssubstanz eingerichtet ist zum Vermitteln einer ionischen Bindung, einer Wasserstoffbrückenbindung und/oder einer hydrophoben Wechselwirkung.
- 15 3. Vesikel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Poreneinheit ein Protein oder einen Proteinteil enthält, das/der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
  - a) einem Transmembranprotein,
  - b) einem Transmembranprotein mit einer alpha-helikalen Transmembran-
  - 20 Struktur,
  - c) einem Transmembranprotein mit einer  $\beta$ -Fass-Transmembran-Struktur,
  - d) einer Transmembran-Struktur eines Transmembranproteins, und
  - e) einem Protein, dass eine zu einer Transmembranstruktur eines der Proteine gemäß a), b), c) und/oder d) strukturhomologe Struktur besitzt.
- 25 4. Vesikel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Poreneinheit einen inneren Porendurchmesser von mehr als 0,1 nm Breite besitzt.
5. Vesikel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Poreneinheit eine enantioselektive Pore bildet.

6. Vesikel nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Vesikel im Vesikel-Inneren ein positiv geladenes Oligomer oder Polymer besitzt.
7. Vesikel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Vesikel im  
5 Vesikel-Inneren Polylysin enthält.
8. Verwendung eines Vesikels nach einem der vorherigen Ansprüche zum Binden einer Substanz.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die zu bindende Substanz eine Nukleinsäure ist.
- 10 10. Verfahren zum Binden einer Nukleinsäure, umfassend das Inkontaktbringen der zu bindenden Nukleinsäure mit einem Vesikel nach einem der Ansprüche 1 bis 7.
11. Verfahren zum Abgeben einer Nukleinsäure, umfassend die Schritte:
  - a) Binden einer Nukleinsäure in einem Vesikel durch ein Verfahren nach  
15 Anspruch 10, und
  - b) anschließend Freisetzen der gebundenen Nukleinsäure durch Anlegen einer Scherspannung an das Vesikel und/oder Auflösen des Vesikels, und/oder durch Zugabe eines Salzes.

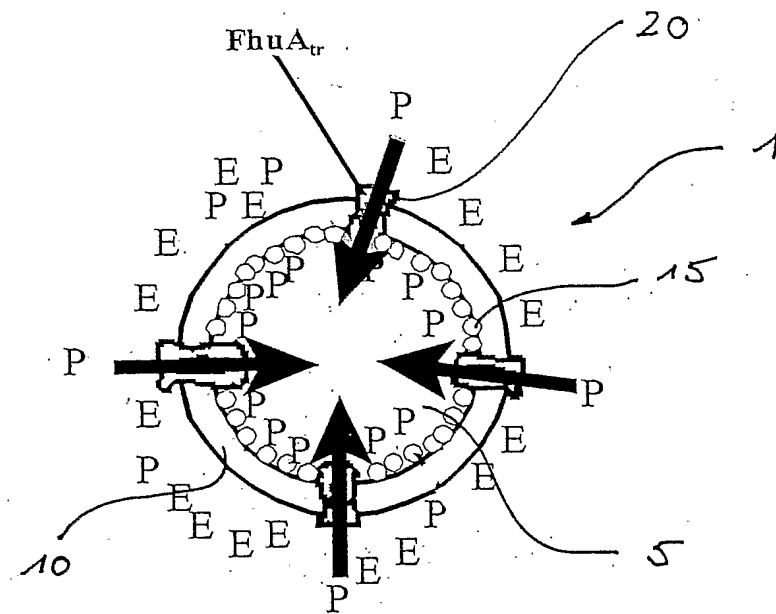
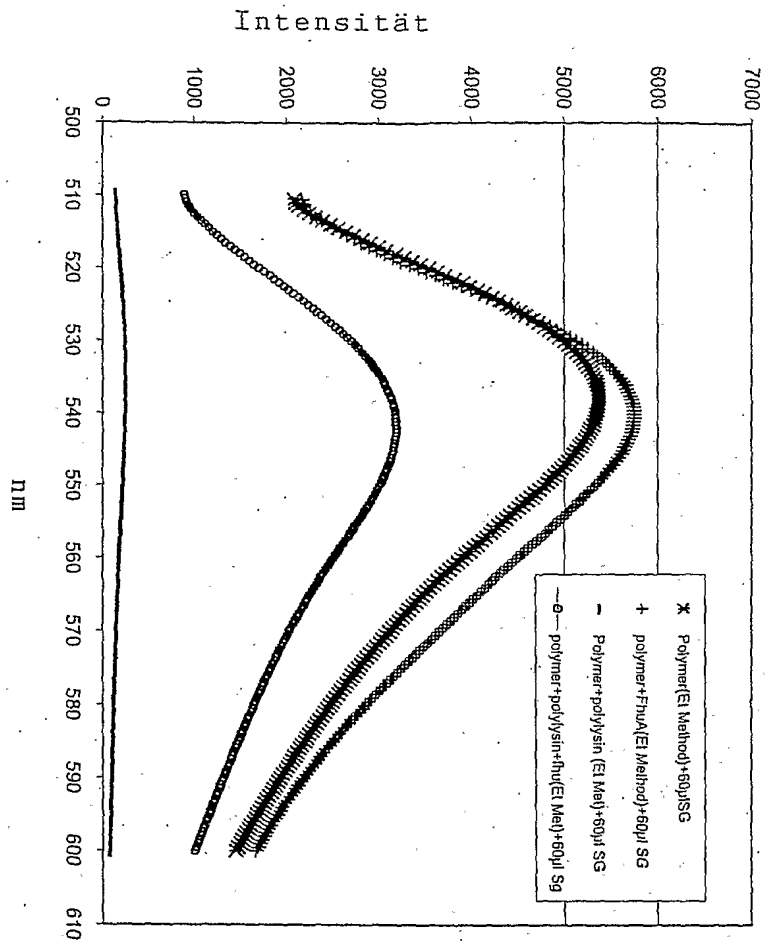
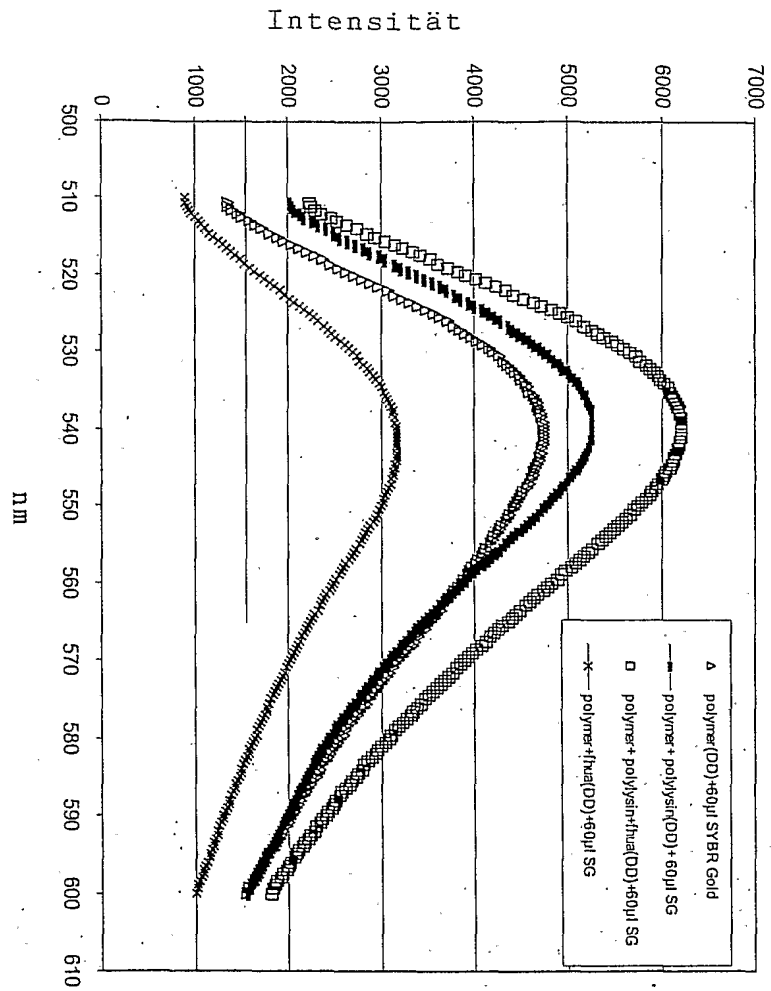


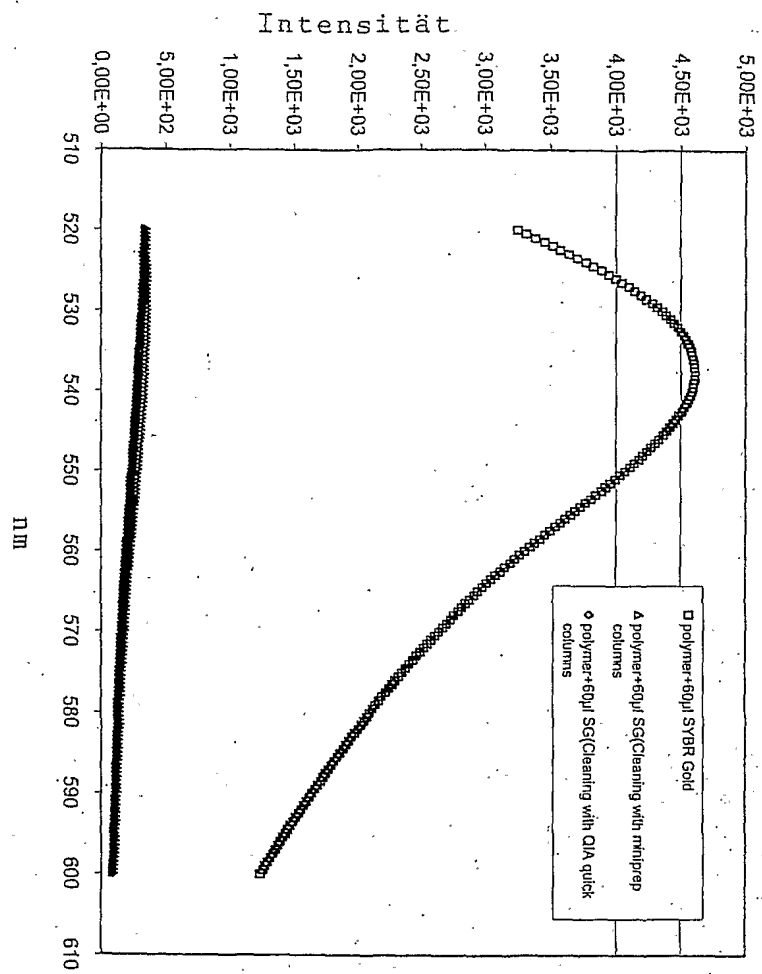
Fig. 1



Figur 2: Fluoreszenz-Messung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60  $\mu$ l SYBR Gold (SG) zu den Vesikeln mit und ohne DNA. Vesikel wurden hergestellt entsprechend dem "Ethanol"-Verfahren (Et Method; Et Met). Reinigungsverfahren 1 wurde angewendet zum Abtrennen.

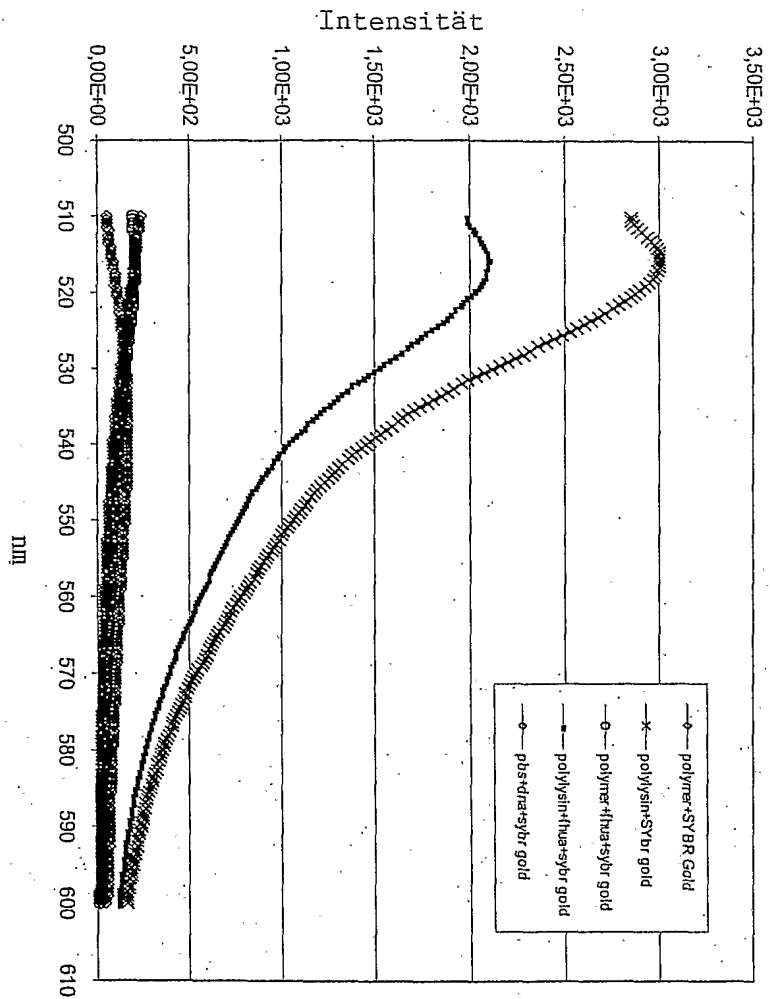


Figur 3: Fluoreszenz-Messung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60  $\mu$ l SYBR Gold (SG) zu den Vesikeln mit und ohne DNA. Vesikel wurden hergestellt entsprechend dem "direktes Auflösen"-Verfahren (DD). Reinigungsverfahren 1 wurde zum Abtrennen verwendet.

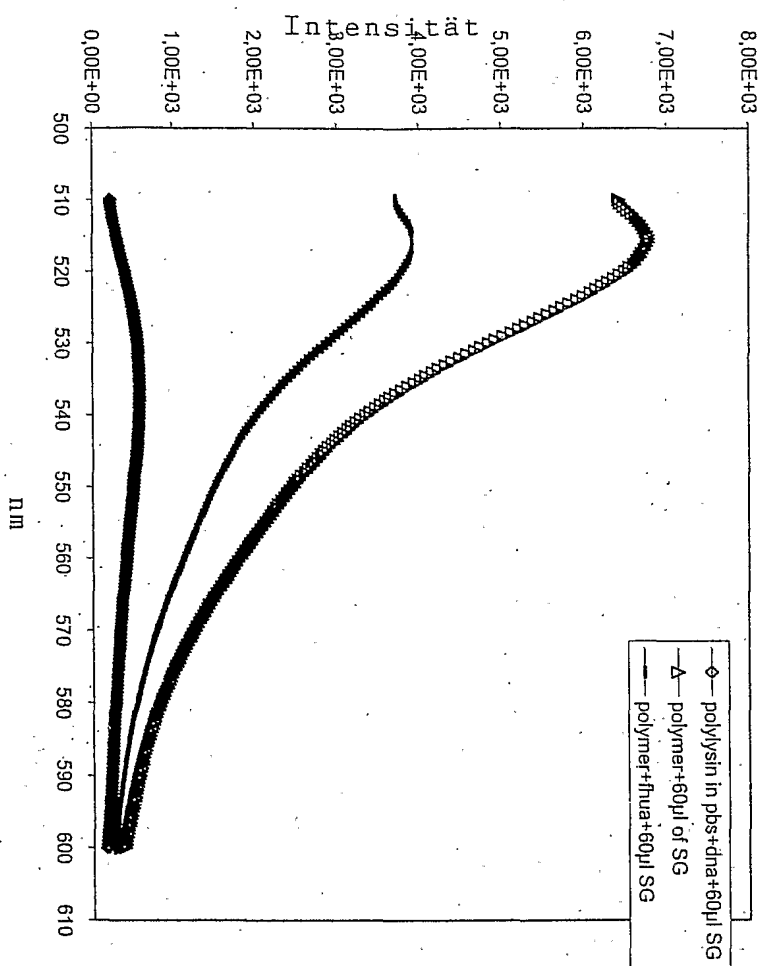


Figur 4: Fluoreszenz-Messung von 520 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold(SG) zur Vesikel-Suspension. Vesikel wurden hergestellt entsprechend dem "Ethanol"-Verfahren. Reinigungsverfahren 2 wurde zum Abtrennen verwendet.





Figur 5: Fluoreszenz-Messung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60 µl SYBR Gold zu den Vesikeln mit und ohne DNA. Vesikel wurden hergestellt entsprechend dem "Ethanol"-Verfahren. Reinigungsverfahren 3 wurde zum Abtrennen verwendet.



Figur 6: Fluoreszenz-Messung von 500 nm bis 610 nm nach Zugabe von 60µl SYBR Gold (SG) zu den Vesikeln mit und ohne DNA ("direktes Auflösen"-Verfahren).

## SEQUENCE LISTING

<110> International University Bremen GmbH

5

<120> Vesikel zum Abtrennen von Substanzen aus flüssigen Medien

10

<130> IA 820-01EP

15

<160> 2

20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

25

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

35

<223> forward primer for PCR amplification

<220>

<221> misc\_feature

40

<222> (4)..(9)

<223> BsaI restriction site

45

<220>

<221> misc\_feature

50

<222> (10)..(15)

<223> EcoRI restriction site

55

<220>

<221> misc\_feature

60

<222> (19)..(21)

<223> "start" codon

65

<400> 1  
atgggtctcg aattccggat gcgcgctgaa attatgcgt 39

5 <210> 2  
<211> 40  
<212> DNA  
10 <213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> reverse primer for PCR amplification  
<220>  
20 <221> misc\_feature  
<222> (4)..(10)  
25 <223> Nco restriction site

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(16)  
35 <223> XhoI restriction site

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(19)  
45 <223> "stop" codon

<400> 2  
50 catgccatgg ctcgagttag aaacggaagg ttgcggttgc 40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/001039

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/32146 A (HIRT THOMAS ; MEIER WOLFGANG (CH); NARDIN CORINNE (FR); BIOCURE INC (U) 10 May 2001 (2001-05-10) cited in the application page 15, line 20 - line 22 page 16, line 3 - line 17 page 16, line 29 - line 31 example 2	1-5, 8
Y	WO 03/106589 A (LYOTROPIC THERAPEUTICS INC) 24 December 2003 (2003-12-24) abstract page 13, line 27 - page 16, line 1 figure 1  ----- -/--	1-5, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 April 2005

Date of mailing of the international search report

06/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2005/001039

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NARDIN CORINNE ET AL: "Hybrid materials from amphiphilic block copolymers and membrane proteins."  JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. MAR 2002, vol. 90, no. 1, March 2002 (2002-03), pages 17-26, XP009040280  ISSN: 0168-1656  cited in the application  abstract  page 19, right-hand column, last paragraph  - page 21, right-hand column, paragraph 1  page 22, left-hand column, last paragraph  - page 24, right-hand column, line 2  figure 5</p>	1-11
A	<p>WO 00/32812 A (GRANT ANNE ROSEMARY ; NYCOMED PHARMA AS (NO); JOHNE BERIT (NO); IHLE O) 8 June 2000 (2000-06-08)  abstract  page 27, line 35 - page 28, line 1</p>	1-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001039

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0132146	A	10-05-2001	AU 3267301 A	14-05-2001
			CA 2388344 A1	10-05-2001
			EP 1225873 A2	31-07-2002
			JP 2003518015 T	03-06-2003
			WO 0132146 A2	10-05-2001
WO 03106589	A	24-12-2003	US 2003232340 A1	18-12-2003
			WO 03106589 A1	24-12-2003
			AU 2002320083 A1	31-12-2003
			CA 2488705 A1	24-12-2003
WO 0032812	A	08-06-2000	AT 259426 T	15-02-2004
			AU 771985 B2	08-04-2004
			AU 1398000 A	19-06-2000
			BR 9915809 A	21-08-2001
			CA 2353103 A1	08-06-2000
			CN 1344331 A	10-04-2002
			CZ 20011905 A3	13-03-2002
			DE 69914804 D1	18-03-2004
			DE 69914804 T2	15-07-2004
			DK 1144692 T3	14-06-2004
			EP 1144692 A1	17-10-2001
			ES 2212681 T3	16-07-2004
			WO 0032812 A1	08-06-2000
			JP 2002531099 T	24-09-2002
			NO 20012630 A	27-06-2001
			US 2004253584 A1	16-12-2004

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/001039

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12Q1/68 G01N33/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 01/32146 A (HIRT THOMAS ; MEIER WOLFGANG (CH); NARDIN CORINNE (FR); BIOCURE INC (U) 10. Mai 2001 (2001-05-10) in der Anmeldung erwähnt Seite 15, Zeile 20 - Zeile 22 Seite 16, Zeile 3 - Zeile 17 Seite 16, Zeile 29 - Zeile 31 Beispiel 2	1-5,8
Y	WO 03/106589 A (LYOTROPIC THERAPEUTICS INC) 24. Dezember 2003 (2003-12-24) Zusammenfassung Seite 13, Zeile 27 - Seite 16, Zeile 1 Abbildung 1 ----- -/-	1-5,8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. April 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/05/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/001039

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>NARDIN CORINNE ET AL: "Hybrid materials from amphiphilic block copolymers and membrane proteins." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. MAR 2002, Bd. 90, Nr. 1, März 2002 (2002-03), Seiten 17-26, XP009040280 ISSN: 0168-1656 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 19, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 21, rechte Spalte, Absatz 1 Seite 22, linke Spalte, letzter Absatz - Seite 24, rechte Spalte, Zeile 2 Abbildung 5</p>	1-11
A	<p>WO 00/32812 A (GRANT ANNE ROSEMARY ; NYCOMED PHARMA AS (NO); JOHNE BERIT (NO); IHLE O) 8. Juni 2000 (2000-06-08) Zusammenfassung Seite 27, Zeile 35 - Seite 28, Zeile 1</p>	1-11

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001039

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0132146	A	10-05-2001	AU 3267301 A	14-05-2001
			CA 2388344 A1	10-05-2001
			EP 1225873 A2	31-07-2002
			JP 2003518015 T	03-06-2003
			WO 0132146 A2	10-05-2001
WO 03106589	A	24-12-2003	US 2003232340 A1	18-12-2003
			WO 03106589 A1	24-12-2003
			AU 2002320083 A1	31-12-2003
			CA 2488705 A1	24-12-2003
WO 0032812	A	08-06-2000	AT 259426 T	15-02-2004
			AU 771985 B2	08-04-2004
			AU 1398000 A	19-06-2000
			BR 9915809 A	21-08-2001
			CA 2353103 A1	08-06-2000
			CN 1344331 A	10-04-2002
			CZ 20011905 A3	13-03-2002
			DE 69914804 D1	18-03-2004
			DE 69914804 T2	15-07-2004
			DK 1144692 T3	14-06-2004
			EP 1144692 A1	17-10-2001
			ES 2212681 T3	16-07-2004
			WO 0032812 A1	08-06-2000
			JP 2002531099 T	24-09-2002
			NO 20012630 A	27-06-2001
			US 2004253584 A1	16-12-2004